

105  
# 20 69/183908



**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> <b>C12N 15/31, C07K 14/37, C12N 1/21, 15/62, A61K 39/35, G01N 33/569</b>		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/06122</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. März 1995 (02.03.95)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT94/00121</b>  <b>(22) Internationales Anmeldedatum: 24. August 1994 (24.08.94)</b>  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> A 1726/93                      27. August 1993 (27.08.93)                      AT  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).</b>  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ACHATZ, Gernot [AT/AT]; Schießstattstrasse 7/III/7, A-5020 Salzburg (AT). OBERKOFER, Hannes [AT/AT]; A-5732 Mühlbach 98 (AT). SIMON, Birgit [AT/AT]; Dirnböckweg 17, A-8700 Leoben (AT). UNGER, Andrea [AT/AT]; Zaisberg 14, A-5201 Seekirchen (AT). LECHENAUER, Erich [AT/AT]; Döttlstrasse 16, A-5400 Hallein (AT). HIRSCHWEHR, Reinhold [AT/AT]; Nauseagasse 18/10, A-1160 Wien (AT). EBNER, Christoph [AT/AT]; St. Elisabethplatz 4/13, A-1040 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Montigasse 1, A-1170 Wien (AT). PRILLINGER, Hans-Jörg [AT/AT]; Ebersbrunn 70, A-3711 Ebersbrunn (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Alfred Kubinstrasse 11/11, A-5020 Salzburg (AT).		<b>(74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).</b>  <b>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title: RECOMBINANT ALTERNARIA ALTERNATA ALLERGENES</b>  <b>(54) Bezeichnung: RECOMBINANTE ALTERNARIA ALTERNATA ALLERGENE</b>  <b>(57) Abstract</b>  <p>The invention concerns recombinant DNA molecules which code for polypeptides possessing the antigenicity of the allergenes Alta53, Alta22 and Alta11 or for peptides having at least one epitope of these allergenes. These molecules are characterized in that they contain nucleic-acid sequences which correspond in homologous fashion to the sequences 1, 3-5, 7-9, 12 and 13 or to parts of these sequences, or nucleic-acid sequences which hybridize with the above nucleic-acid sequences under strictly controlled conditions.</p>			
<b>(57) Zusammenfassung</b>  <p>Die Erfindung bezieht sich auf rekombinante DNA Moleküle, die für Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene Alta53, Alta22 und Alta11 besitzen oder für Peptide, die mindestens ein Epitop dieser Allergene aufweisen. Diese Moleküle sind dadurch gekennzeichnet, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die mit den Sequenzen 1, 3-5, 7-9, 12 und 13, oder mit Teilbereichen dieser Sequenzen in homologer Weise übereinstimmen, bzw. Nucleinsäuresequenzen, die mit den genannten Nucleinsäuresequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

### Rekombinante *Alternaria alternata* Allergene

Die Erfindung bezieht sich auf rekombinante DNA Moleküle, die für Polypeptide kodieren, die die Antigenität der Allergene Alta53, Alta22 und Alta11 besitzen, oder für Peptide, die mindestens ein Epitop dieser Allergene aufweisen.

5 Die genannten Allergene von *Alternaria alternata*, sowie die von den cDNA-Primärsequenzen dieser Allergene abgeleiteten Peptidsequenzen führen bei Pilzallergikern zu einer pathologischen Immunantwort mit einem Überschießen von IgE-Antikörpern. Rekombinante Allergene bzw. immunogen wirkende Teilpeptide können neben einer verbesserten Diagnostik auch zu einer in vivo oder in vitro Induktion einer Immuntoleranz bzw. Anergie von T-Lymphozyten Verwendung  
10 finden.

Allergien nehmen nach epidemiologischen Untersuchungen in den letzten Jahren an Häufigkeit zu. Die Ursachen der allergischen Krankheiten sind vielfältig. Allergene wie Pollen, Tierhaare und Exkremente von Hausstaubmilben sind heute wohl jedem schon ein Begriff (Wüthrich 1991, Miyamoto 1992). Schimmelpilze lassen aber für Fachleute hinsichtlich ihrer biologischen und allergologischen  
15 Bedeutung viele Fragen offen. Es sind nicht zuletzt die äußerst große Variabilität und Adaptionfähigkeit auf unterschiedliche Lebensbedingungen, die die Forschungsarbeit mit diesen Pilzen erschweren. 98% der bekannten Pilze sind Landbewohner. Für die meisten Pilze stellen klimatische Verhältnisse mit einer Luftfeuchtigkeit von 80% und Temperaturen um 20°C ideale Lebens- und Fortpflanzungsbedingungen dar.

20 Die Mechanismen bei Schimmelpilzallergien sind nicht genau bekannt und scheinen komplexer und komplizierter als bei üblichen Inhalationsallergien vom Soforttyp zu sein. Möglichkeiten einer Sensibilisierung über den Verdauungstrakt und nicht nur über den Respirationstrakt werden diskutiert und sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeit.

Allergien vom Soforttyp (Typ1-Allergie) werden durch IgE Antikörper  
25 ausgelöst, die Effektorzellen (Mastzellen des Schleimhaut- und Bindegewebstypus sowie Basophile Granulozyten des Blutes) mit ihren Fc-Teil über Rezeptoren kontaktieren und bei Allergenkontakt zu einer Freisetzung von Entzündungsstoffen (Histamin, Heparin, Arachidonsäuremetaboliten etc.) führen (Roitt 1991, Klein 1990). Die Bildung solcher IgE-Antikörper erfolgt durch B-Lymphozyten, die durch lösliche Stoffe (Lymphokine), die von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert werden,  
30 zur Sekretion der Antikörper stimuliert werden (Parronchi et al. 1991).

Am Beginn jeder Immunantwort stehen Zellen, die vorhandenes Antigen aktiv phagozytieren. Aus diesem Grund werden diese Zellen auch "Freßzellen" genannt. Es handelt sich hierbei um dendritische Zellen aber auch um Monozyten, die im späteren Stadium zu Makrophagen differenzieren. Alle diese Zellen besitzen die Fähigkeit der DIAPYCNÖSE, was ihnen ermöglicht, das Blutssystem zu verlassen und  
5 in Körperhöhlräume etc. vorzudringen. Den Hauptanteil der Antigenvernichtung tragen die Makrophagen. Sie zerlegen das Antigen nach der Phagocytose in hochimmunogene Peptide (Durchschnittsgröße ca. 15 Aminosäuren) und präsentieren diese zusammen mit dem auf den Makrophagen exprimierten MHC-Proteinen (major histocompatibility), den T-Lymphocyten. Die zentrale Rolle der T-Lymphocyten wird an diesem Punkt unterstrichen. Nur an diesem Punkt der Immunantwort kann  
10 unterschieden werden, und das ist die zentrale Rolle der T-Lymphocyten, ob das dargebotene Antigen "fremd" oder "eigen" ist. Erfolgt hier die Entscheidung "fremd", so steht der weiteren Bekämpfung des Antigens nichts mehr im Wege. Die Erkennung des Fremdproteins im Kontakt mit eigenem MHC führt zur weiteren Differenzierung der T-Lymphocyten zu Plasmazellen, die schließlich Interleukine sezernieren. Diese Interleukin-Sekretion führt zur Aktivierung von B-Lymphocyten,  
15 die ihrerseits das lösliche Antigen erkannt haben, aber erst die "Mitteilung" der T-Lymphocyten über die Interleukine für die eigene Differenzierung benötigen. Es folgt die Differenzierung der B-Lymphocyten zu Plasmazellen, wo nun beim Atopiker größere Mengen Antikörper der IgE-Klasse sezerniert werden.

Wurde noch auf T-Zellebene das Antigen als "eigen" erkannt, wird die Immunantwort unter normalen Umständen an diesem Punkt abgebrochen. Die  
20 komplexe Regulationskaskade des Immunsystems birgt jedoch eine Menge möglicher Fehler in sich. Zeuge dieses Umstandes sind die vielen, meist tödlich verlaufenden, klinischen Fälle von Autoimmunkrankheiten, bei denen das körpereigene Immunsystem nicht zwischen "selbst" und "nicht-selbst" unterscheiden kann.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Diagnose und somit auch die Therapie von allergischen Erkrankungen nicht zufriedenstellend. Die molekulare Charakterisierung  
25 der Hauptallergene von *Alternaria* mittels cDNA-Klonierung, Sequenzierung, Sequenzvergleich des allergenen Proteins mit Proteindatenbanken, sowie die Produktion von rekombinanten Allergenen wird mehr Aufschluß über die in vivo Funktion der Proteine geben, die die falschen Immunreaktionen auslösen. Diese Informationen sind aus folgenden Gründen interessant:

1) Hochreine rekombinante Allergene können für eine sorgfältigere Diagnose,  
30 besser als es heute mit Rohextrakten möglich ist, herangezogen werden.

2) Die Sequenz der Allergene wird dabei helfen, tolerogene Peptide zu definieren und eventuell auch den "IgE-Class-switch", der bei der Immunisierung mit dem Allergen passiert, verstehen zu lernen.

Seit Jahrzehnten werden IgE bedingte Allergien, so z.B. auch Allergien gegen Pilzsporen, durch Hyposensibilisierung therapiert (Bousquet et al. 1991). Diese Therapie besteht in der Zufuhr von Allergenextrakten in Form von Injektionen oder peroraler Applikation in wässriger Form als Tropfen in steigender Dosierung, bis eine Erhaltungsdosis über mehrere Jahre erreicht ist. Resultat dieser Therapie ist das Erreichen einer Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen, was sich in einer Abnahme der Krankheitssymptome äußert (Birkner et al. 1990). Das Problem bei dieser Art der Behandlung liegt in der Vielzahl der dadurch auftretenden Nebenwirkungen. Bei der Hyposensibilisierungstherapie sind Fälle von anaphylaktischem Schock während der Behandlung aufgetreten. Das Problem hierbei liegt in der schweren Standardisierbarkeit der Pilzprotein-Isolate. Bei einem Einsatz von Allergen-abgeleiteten, aber nicht anaphylaktisch wirkenden Peptiden, könnten risikolos höhere Dosen verabreicht werden, wodurch eine wesentliche Verbesserung der Hyposensibilisierung erreicht werden kann.

*Alternaria alternata* ist praktisch überall in der Natur anzutreffen. Beliebte Standorte, bzw. Lebensräume des Pilzes sind verschiedene Bodentypen, Getreidesilos, verrottetes Holz, aber auch lebende Pflanzen, Kompostplätze und Vogelnester. Findet man auf Tomaten schwarze Flecken, so rühren auch sie mit großer Wahrscheinlichkeit von *Alternaria* her. Aber nicht nur in freier Natur ist *Alternaria alternata* anzutreffen. Sehr häufig findet man den Pilz in feuchten Innenräumen und an Fensterrahmen. Warme Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit begünstigen das Wachstum des Pilzes im allgemeinen.

Man zählt heute *Alternaria alternata* zu den wichtigsten Allergie auslösenden Pilzen. Yunginger et al. (1989) charakterisierten die erste allergene Fraktion und isolierten das erste als Allergen wirkende Protein Alt1. Ein großes Problem bei *Alternaria alternata* ist die Variationsbreite des Pilzes: Variationen im Proteinstmuster aber auch variable Potenz der Allergieauslösung sind des öfteren beschrieben worden. Nyholm et al. (1983) zeigten, daß es sich bei Ag1 und Alt-1 um dasselbe Allergen handelt, daß aber in unterschiedlichen Stämmen von *Alternaria alternata* eine Variationsbreite des Proteins möglich ist. Der Reviewartikel von Budd (1986) beschreibt die Isolierung des allergenen Proteins Alt-1, nun Alt1. Vollständige cDNA Sequenzen von allergenen Proteinen von *Alternaria alternata* sind bis heute nicht publiziert worden. Verschiedene Studien zeigen jedoch starke Kreuzreaktionen zwischen *Alternaria alternata*, *Stemphylium* und *Curvularia* (Agarwal 1982).

Erfindungsgemäß werden Rekombinante DNA Moleküle der eingangs genannten Art geschaffen, die Nucleinsäuresequenzen aufweisen, die mit den Sequenzen 1, 3-5, 7-9 sowie 12 und 13, oder mit Teilbereichen dieser Sequenzen in homologer Weise übereinstimmen, bzw. Nucleinsäuresequenzen, die mit den genannten Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Die DNA Moleküle können auch Nucleinsäuresequenzen aufweisen, die durch Degeneration aus den vorgenannten Sequenzen ableitbar sind.

Weitere Merkmale des Erfindungsgegenstandes gehen aus den nachstehenden Darlegungen hervor.

Beispiele:

a) Beschreibung der allergenen Proteine von *Alternaria alternata* mittels Western-Blotting

Für die Klonierung der vorliegenden Allergene von *Alternaria alternata* standen 142 Patientensera zur Verfügung. Um die Reaktivität der Patienten mit Pilzproteinextrakt zu testen, wurde *Alternaria alternata* (Sammlung Prof. Windisch Berlin Nummer: 08-0203) auf festem Medium (2% Glukose, 2% Pepton, 1% Hefeextrakt) gezüchtet. Für die Proteinextraktion wurde die Pilzmatte nach 3 Tagen Wachstum bei 28°C abgezogen und mit flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die Auftrennung der extrahierten Proteine erfolgte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel, das anschließend geblottet, mit Patientenserum inkubiert und mit <sup>125</sup>I-markiertem anti human IgE detektiert wurde. In Prozentzahlen ausgedrückt reagierten die Patienten auf die allergenen Proteine wie folgt:

20	Alta53	44,8%
	Alta22	3,4%
	Alta11	10,3%

Wurde Protein aus gekauftem Pilzmaterial der Firma Allergon (Schweden) isoliert und für den Immunblot verwendet, konnte nahezu dasselbe Bandenmuster detektiert werden. Wie aus diesen Zahlen ersichtlich ist, handelt es sich bei Alta53 um ein Haupt-, bei Alta22 und Alta11 um ein Nebenallergen.

Figur 1 zeigt einen Überblick über das zur Klonierung der beschriebenen Allergene zur Verfügung gestandene Patientenspektrum. Das Bild zeigt ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel. Die Patienten mit der Nummer 35 und 40 (es handelt sich hier auch um die Patienten die für das spätere Screenen verwendet wurden) zeigen 30 Banden in der Größenordnung 53kD, 22kD und 11kD.

Fig.1 zeigt dabei ein Westernblotting eines 12,5%iges Polyacrylamidgels, nach Auftrennung von *Alternaria alternata* Proteinextrakt; Inkubation mit Sera verschiedener Patienten; Detektion mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem anti human IgE.

#### 5 b) Konstruktion der cDNA Expressionsbank

Gesamt RNA wurde nach der sauren Guanidium-Phenol-Extraktionsmethode aus selbst gezüchtetem Pilzmaterial gewonnen. poly(A)plus Anreicherung erfolgte mit Oligo(dT) Cellulose der Firma Böhlinger. Die cDNA Synthese (1. und 2. Strang) wurde durchgeführt, wie im Manual des Lambda ZAP-Systems der Firma Stratagene beschrieben. Die cDNA wurde anschließend (3'-seitig) mit EcoRI und 10 (5'-seitig) mit XbaI Linkern versehen, in vorverdaute Lambda-ZAP-Arme ligiert und verpackt. Der Titer der Primärbank betrug 900000 Klone.

#### c)- Screening der cDNA Genbank mit Patientensera, in vivo Excision, Sequenzierung

Das Screenen der Expressionsbank erfolgte mittels Inkubation der "gelifteten" Phagenplaques mit einem Seragemisch aus 2 Patienten, von denen man durch das 15 Westernblotting wußte, daß sie das Spektrum der detektierten Antigene abdecken. Die Detektion erfolgte wieder mit anti human IgE RAST Antikörper der Firma Pharmacia. Nach Sekundär- und Tertiärscreening blieben 150 positive Klone übrig. Aus 12 Klonen wurde mit Hilfe eines Helferphagen der bereits fertig sequenzierbare Bluescriptvektor mit cDNA exzisiert (Durchführung wie im Manual des Lambda ZAP-Kits). Restriktionsverdaue der exzisierten Plasmide zeigten (EcoRI-XbaI 20 Doppelverdaue) 3 verschiedene Inserttypen. Diese 3 Klone wurden nach der Sangermethode (Sanger 1977) sequenziert.

#### d) Expression der Alta53, Alta22 und Alta11 cDNAs als $\beta$ -Galaktosidasefusionsprotein

Mit Hilfe des vorher beschriebenen IgE-Screenings konnten 3 vollständige 25 cDNA-Klone erhalten werden. Die jeweiligen rekombinanten Plasmide wurden in den E.coli Stamm XL1-Blue transformiert und mit IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert. Der E.coli Gesamtproteinextrakt wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Das Fusionsprotein wurde mittels Serum IgE von Pilzallergikern und einem jodmarkiertem Kaninchen anti human IgE Antikörper (Pharmacia, Uppsala 30 Schweden) detektiert.

Die nachfolgenden zwei Figuren zeigen die rekombinanten  $\beta$ -Galaktosidasefusionsproteine nach Inkubation mit Patientenserum und Detektion mit jodmarkiertem anti-human IgE. Der  $\beta$ -Galaktosidaseanteil des Fusionsproteins beträgt 36 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 3800 Dalton gleichkommt. Unter Berücksichtigung dieser "Vergrößerung" des allergenen Proteins sind auch die nachfolgenden Figuren 3 und 4 zu sehen. Spuren (Klone) 1,2,4,5,6,7 zeigen das rekombinante Fusionsprotein Alta11, Spuren 3 und 12 zeigen das rekombinante Fusionsprotein Alta22 und Spuren 8 und 10 das um den Fusionsanteil größer gewordene rekombinante Alta53.

Fig.2 und 3 zeigen somit eine Expression der rekombinanten Proteine Alta52, Alta22 und Alta11 in Bluescript nach IPTG Induktion.

10

#### e) Bestimmung von B- und T-Zell Epitopen bei den rekombinanten Allergenen

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Allergene bietet die Voraussetzung für die Vorhersage von B- und T-Zellepitopen mittels geeigneter Computerprogramme. Mit diesen Untersuchungen können spezifische T- und B-Zell-Epitope definiert werden, die die Fähigkeit besitzen, zB. T-Lymphozyten zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen, aber die Zellen (bei genau definierter Dosis) auch in einen Zustand der Toleranz bzw. Nicht-Reaktivität (Anergie) zu versetzen (Rothbard et al. 1991). Die bestimmten Epitope werden jeweils bei der Beschreibung des rekombinanten Proteins in eigenen Figuren angeführt.

Die Suche nach B-Zellepitopen wurde mit Hilfe des GCG-Programmes (Genetics Computer Group) "PROTCALC", das jedoch von der Arbeitsgruppe um Prof. Modrow mit wesentlichen Parametern erweitert wurde, durchgeführt. Die Bestimmung beruht auf einer Abwägung der Parameter Hydrophilität (Kyte-Doolittle), Sekundärstruktur (Chou-Fasman), Oberflächenlokalisation (Robson-Garnier) und Flexibilität, wodurch die Antigenität von Teilpeptiden errechnet wird.

Das Prinzip der T-Zellepitop-Voraussage erfolgte im Prinzip nach dem Algorithmus von Margalit et al. (1987). Das Prinzip besteht in der Suche nach amphipathischen Helices laut Primärsequenz des zu bestimmenden Proteins, flankiert von hydrophilen Bereichen. Der berechnete Score muß für relevante T-Zellepitope größer als 10 sein. Bei MHC II assoziierten Peptiden kann kein Konsensus, weder der Sequenz noch der Länge des Peptids nach, wie bei HLA-A2 (human leucocyte antigen) (MHC I) assoziierten definiert werden. Bei HLA-A2 assoziierten Peptiden beträgt die Länge des Peptids 10 Aminosäuren, wobei die 2. Aminosäure ein Tyrosin und die letzte Aminosäure ein Leucin darstellt (Rammensee et al. 1993). Die

berechneten Epitope werden bei der Beschreibung der einzelnen allergenen Sequenzen getrennt angeführt.

#### Molekulare Charakterisierung der klonierten Pilzallergene (Sequenzprotokolle)

5 Im folgenden werden nun die cDNA Sequenzen und die mit ihnen durchgeführten Analysen der Reihe nach angeführt. Die Computerauswertung der nachfolgenden Sequenzen wurden auf einer Ultrix-DEC 5000 Workstation unter Zuhilfenahme des GCG-Softwarepaketes (=Wisconsin Paket: die Algorithmen dieses Paketes wurden von der "University of Wisconsin" entwickelt) durchgeführt.

#### 10 A. Alta53

Die nachfolgende Sequenz 1 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz von Alta53 beginnend mit dem Start-ATG. Die Länge der cDNA beträgt 1488bp, was einem berechneten Molekulargewicht von 53543 Dalton entspricht. Die beobachtete Bande im Westernblot bei 53kD korreliert somit dem Molekulargewicht nach mit dem klonierten und sequenzierten Allergen. Dem reifen Protein dürfte nach bisheriger  
15 Analyse kein Signalpeptid voranstehen.

Sequenz 1: Alta53=ALDH<sub>alt</sub> -> 1-phasen Translation 53543 Dalton

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1488 Basenpaare / 496 Aminosäurereste

(B) ART: Nukleinsäure / Protein

(C) STRANGFORM: ds

(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA / Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: Gesamtsequenz

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

30 (C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

DNA sequence 1488 b.p. ATGACATCTGTA ... CTGTTCCGGTTAA linear

1 / 1  
 ATG ACA TCT GTA AAG CTC TCA ACC CCT CAG 31 / 11  
 met thr ser val lys leu ser thr pro gln thr gly glu phe glu gln pro thr gly leu  
 61 / 22  
 TTC ATC AAC AAT GAG TTC GTA AAG GCT GTT GAC GGC AAG ACC TTT GAT GTT ATC AAC CCC  
 phe ile asn asn glu phe val lys ala val asp gly lys thr phe asp val ile asn pro  
 122 / 41  
 TCC ACT GAG GAG GTC ATC TGC AGT GTT CAG GAG GCC ACC GAG AAG GAT GTT GAC ATT GCT  
 ser thr glu glu val ile cys ser val gln glu ala thr glu lys asp val asp ile ala  
 181 / 61  
 5 GTT GCT GCC GCC CGC AAA GCC TTC AAC GGC CCA TGG gca AAG GAG ACA CCA GAG AAC AGG  
 val ala ala ala arg lys ala phe asn gly pro trp ala lys glu thr pro glu asn arg  
 241 / 81  
 GGA AAG CTG CTT AAC AAG CTT GCC GAT CTG TTC GAG AAG AAT GCC GAC CTC ATT GCT GCT  
 gly lys leu leu asn lys leu ala asp leu phe glu lys asn ala asp leu ile ala ala  
 301 / 101  
 GTC GAG GCT CTC GAC AAC GGC AAG GCC TTC AGC ATG GCC AAG AAC GTC GAT GTT CCC GCC  
 val glu ala leu asp asn gly lys ala phe ser met ala lys asn val asp val pro ala  
 361 / 122  
 GCC GCT GGT TGC CTG AGG TAC TAC GGA GGA TGG GCC GAC AAG ATT GAG GGC AAG GTC GTC  
 ala ala gly cys leu arg tyr tyr gly gly trp ala asp lys ile glu gly lys val val  
 422 / 141  
 10 GAC ACA GCA CCC GAC AGC TTC AAC TAC ATC CGC AAG AGC CTA TTG GTG TTT GCG GTC AGA  
 asp thr ala pro asp ser phe asn tyr ile arg lys ser leu leu val phe ala val arg  
 481 / 161  
 TCA TCC ATG GAA CTT CCT ATT CTC ATG TGG TCA TGG AAG ATT GGT CCT GCC ATC GCC ACT  
 ser ser met glu leu pro ile leu met trp ser trp lys ile gly pro ala ile ala thr  
 541 / 181  
 GGT AAC ACC GTC GTC CTG AAG ACT GCT GAG CAG ACA CCT CTC TCC GCA TAC ATT GCC TGC  
 gly asn thr val val leu lys thr ala glu gln thr pro leu ser ala tyr ile ala cys  
 601 / 201  
 AAG CTG ATC CAG GAG GCC GGT TTC CCA CCA GGT GTC ATC AAC GTC ATC ACT GGT TTC GGA  
 lys leu ile gln glu ala gly phe pro pro gly val ile asn val ile thr gly phe gly  
 661 / 222  
 15 AAG ATC GCC GGT GCT GCC ATG TCC GCT CAC ATG GAC ATT GAC AAG ATT GCC TTT ACT GGT  
 lys ile ala gly ala ala met ser ala his met asp ile asp lys ile ala phe thr gly  
 722 / 241  
 TCA ACC GTT GTC GGC CGT CAA ATC ATG AAG TCT GCG GCT GGC TCC AAC TTG AAG AAG GTC  
 ser thr val val gly arg gln ile met lys ser ala ala gly ser asn leu lys lys val  
 781 / 261  
 ACT CTT GAG CTC GGA GGC AAG AGC CCC AAC ATT GTC TTC GCC GAC GCA GAT CTT GAC GAG  
 thr leu glu leu gly gly lys ser pro asn ile val phe ala asp ala asp leu asp glu  
 841 / 281  
 GCT ATC CAC TGG GTC AAC TTT GGT ATT TAC TTC AAC CAC GGA CAG GCT TGT TGT GCT GGT  
 ala ile his trp val asn phe gly ile tyr phe asn his gly gln ala cys cys ala gly  
 901 / 301  
 20 TCG CGT ATC TAC GTC CAA GAA GAG ATC TAC GAC AAG TTC ATC CAG CGC TTC AAG GAG CGG  
 ser arg ile tyr val gln glu glu ile tyr asp lys phe ile gln arg phe lys glu arg  
 961 / 322  
 GCT GCT CAG AAC GCT GTT GGT GAC CCA TTC GCC GCG ACA CTC CAG GGT CCT CAA GTC TCG  
 ala ala gln asn ala val gly asp pro phe ala ala thr leu gln gly pro gln val ser  
 1022 / 341  
 CAG CTC CAG TTC GAC CGT ATC ATG GGC TAC ATC GAG GAG GGC AAG AAG TCT GGC GCG ACC  
 gln leu gln phe asp arg ile met gly tyr ile glu glu gly lys lys ser gly ala thr  
 1081 / 361  
 ATC GAG ACT GGT GGC AAC CGT AAG GGT GAC AAG GGT TAC TTC ATC GAG CCC ACA ATC TTC  
 ile glu thr gly gly asn arg lys gly asp lys gly tyr phe ile glu pro thr ile phe  
 1141 / 381  
 25 TCC AAC GTA ACC GAG GAC ATG AAG ATT CAG CAA GAA GAG ATC TTC GGC CCC GTC TGC ACA  
 ser asn val thr glu asp met lys ile gln gln glu glu ile phe gly pro val cys thr  
 1201 / 401  
 ATC TCC AAG TTC AAG ACA AAG GCC GAC GTC ATC AAG ATT GGC AAC AAC ACC ACA TAC GGT  
 ile ser lys phe lys thr lys ala asp val ile lys ile gly asn asn thr thr tyr gly  
 1261 / 422  
 Ctt tcc GCC GCT GTA CAC ACA TCC AAC CTC ACC ACT GCC ATC GAA GTT GCC AAC GCG CTC  
 leu ser ala ala val his thr ser asn leu thr thr ala ile glu val ala asn ala leu  
 1322 / 441  
 CGT GCA GGA ACT GTC TGG GTC AAC TCC TAC AAC ACT CTT CAC TGG CAG CTT CCC TTC GGA  
 arg ala gly thr val trp val asn ser tyr asn thr leu his trp gln leu pro phe gly  
 1381 / 461  
 30 GGG TAC AAG GAG TCT GGT ATT GGG CGC GAG TTG GGA GAG GCG GCG CTG GAC AAC TAC ATC  
 gly tyr lys glu ser gly ile gly arg glu leu gly glu ala ala leu asp asn tyr ile  
 1441 / 481  
 CAG ACC AAG ACC GTG TCT ATT CGT CTT GGC GAT GTT CTG TTC GGT TAA  
 gln thr lys thr val ser ile arg leu gly asp val leu phe gly OCH

Homologiesuchen mit Alta53 in der SWISSPROT-Proteindatenbank ergaben, daß es sich bei Alta53, wie auch bei Clah53, um eine Aldehyddehydrogenase handelt. Als Beweis der hohen Homologie (über viele Strecken handelt es sich um Identitäten) zeigt die folgende Sequenz 2 ein paarweises Alignment zwischen Alta53 und Clah53. Die Identität (identische Aminosäuren) der beiden Proteine (Allergene) untereinander beträgt 78%. Der Homologiegrad (Identitäten plus homologe Aminosäureaustausche) liegt sogar bei 86%.

## Sequenz 2: ALDH

10	1	MTSVKSLSTPQTGEFEQPTGLFINNEFVKAVDGRKTFDVINPSTEEVICSQVQ	50
		. .  : .  :       : :       . .   .  :	
	1	MTSVQLETPHSGKYEQPTGLFINNEFVKQGEGKTFDVINPSDESUITQVH	50
	51	EATEKDVDIAVAAARKAFNGPWAKETPENRGKLLNKLADLFERNADLIAA	100
		:     .  : .         :     .  :     .  :	
	51	EATEKDVDIAVAAARQAFEGSWRLETPENRGKLLNNLANLFERNADLLAA	100
	101	VEALDNGKAFSMARNVDVPAAGCLRYGGWADKIEGKVVDTPADSFNYI	150
		.         : .  : .  :       :     .  :     .  :	
15	101	VESLDNGKATSMAR.VTSACASGCLRYGGWADKITGKVIDTTPDTFNYV	149
	151	RR.SLLVFAVRSSMELPILMWSWKIGPAIATGNTVVLKTAEQTPLSAYIA	199
		: .:   :	
	150	KKEPIGVCRSDHSLELPLLMWAWKIGPAIACGNTVVLKTAEQTPLGGLVA	199
	200	CKLIQEAGFPPGVINVTGFGKIAGAAMSAHMDIDKIAFTGSTVVGRIQIM	249
		.. : .       : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
20	200	ASLVKEAGFPPGVINVISGFGKVAGAALS SHMDVDKVAFTGSTVVGRTIL	249
	250	KSAAGSNLKKVTTLELGGKSPNIVFADADLDEAIEHWVNFYIYFNGQACCA	299
		.  :	
	250	KAAASSNLKKVTTLELGGKSPNIVFEDADIDNAISWVNFYIYFNGQCCCA	299
	300	GSRIYVQEEIYDKFIQRFKERAQAQNAVGDPPFAA.TLQGPQVSQLOFDRIM	348
		: : : .   : : : : .  : : : : .  : : : : .  : : : :	
	300	GSRVYVQESIYDKFVQRFKERAQKNVVGDPFAADTFQGPQVSKVQFDRIM	349
25	349	GYIEEGKRSGATIEETGGNRKRGDKGYFIEPTIFSNVTEDMKIQEEIFGPV	398
		: : .  .  : : : : .     :     :     :     :	
	350	EYIQAGKDAGATVETGGSRKRGDKGYFIEPTIFSNVTEDMKIVKEEIFGPV	399
	399	CTISKFKTRADVIRKIGNNTTYGLSAAVHTSNLTTAIEVANALRAGTVWVN	448
		. .     .  : : .  : : : : .  : : : : .  : : : :	
	400	CSIAKFRTKEDAIKLGNASTYGLAAAVHTKNLNTAIEVSNALKAGTVWVN	449
	449	SYNTLEWQLPFGGYKESGIGRELGEAALDNYIQTKTVSIRLGDVLFQZ	496
30		.   :	
	450	TYNTLHHOMPFGGYKESGIGRELGEDALANYTOTKTVSIRLGDALFQZ	497

Die NAD-abhängige ALDH ist das Hauptenzym, das an der Oxidation von Azetaldehyd, einem Primärprodukt des Alkoholmetabolismus, im Menschen beteiligt ist. Isoenzyme sind hierbei oft zu finden (Harada et al. 1982). Beim Menschen z.B. findet man das Isoenzym ALDH I in Mitochondrien, ALDH II im Zytoplasma. Interessanterweise ist die Abwesenheit von ALDH I bei Asiaten keine Seltenheit (Harada et al. 1982). Die Defizienz von ALDH I resultiert in einem hohen Spiegel von Acetaldehyd, was sich als sogenanntes "flushing syndrome", sowie anderen vasomotorischen Symptomen nach Alkoholgenuß bemerkbar macht. Der Isoenzymverlust läßt sich auf eine Mutation zurückführen, die das native Protein in seiner Struktur verändert (Hsu et al. 1987). Der Zusammenhang zwischen ALDH und Allergieauslösung ist zum Zeitpunkt noch nicht bekannt.

Die nachfolgende Sequenz 3 zeigt die mit Computersuche identifizierten Bereiche mit hohem, antigenen Index. Diese Bereiche stellen hochpotente B-Zellepitope dar.

### Sequenz 3: Alta53=ALDH\_alt: B-Zellepitope

#### (1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3

20

#### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

(iii) HYPOTHETISCH: nein

25

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Val Lys Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Glu Phe Glu Gln Pro Thr Gly

30

(4-19)

Ala Val Asp Gly Lys Thr Phe (29-35)

Ile Asn Pro Ser Thr Glu Glu (38-44)  
 Gly Pro Trp Ala Lys Glu Thr Pro Glu Asn Arg Gly Lys Leu Leu Asn  
 (70-85)  
 Leu Arg Tyr Tyr Gly Gly Trp Ala Asp Lys Ile Glu Gly (125-137)  
 Asp Thr Ala Pro Asp Ser Phe Asn Tyr Ile Arg Lys Ser (141-153)  
 5 Glu Ala Gly Phe Pro Pro Gly Val (205-212)  
 Gly Ser Asn Leu Lys Lys Val Thr Leu (254-262)  
 Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro Asn Ile (263-271)  
 Tyr Ile Glu Glu Gly Lys Lys Ser Gly Ala Thr (350-360)  
 Ile Glu Thr Gly Gly Asn Arg Lys Gly Asp Lys Gly Tyr Phe Ile Glu  
 (361-376)  
 10 Ile Gly Asn Asn Thr Thr Tyr Gly (413-420)  
 Ala Val His Thr Ser Asn Leu Thr (424-431)

Die nachfolgende Sequenz 4 zeigt die mit Hilfe des Computerprogrammes  
 bestimmten amphipathischen Helices, die von hydrophilen Bereichen flankiert  
 15 werden. Solche Bereiche, mit einem Score höher als 10, stellen mögliche  
 T-Zellepitope dar.

Sequenz 4: Vorausgesagte amphipathatische Segmente  
 T-Zellepitope

-----  
 20 EFEQ  
 FVKA VD  
 KTFDVI  
 KAFNGPWA  
 KLLNKLADLFE  
 IAAVEALDNGKA  
 MAKNVDP  
 25 AAGCLRYYGWADKIEGK  
 VDTAPDSFNY  
 GVINVTGFGKI  
 IYDKFIQRFKERA  
 NAVGDPFAAT  
 QFDRIMGYI  
 GPVCTI  
 AIEVANALR  
 30 RELGEAALD

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

5 (B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

10 (C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Glu Phe Glu Gln (11-16)

Phe Val Lys Ala Val Asp (26-31)

Lys Thr Phe Asp Val Ile (33-38)

Lys Ala Phe Asn Gly Pro Trp Ala (66-73)

15 Lys Leu Leu Asn Lys Leu Ala Asp Leu Phe Glu (82-92)

Ile Ala Ala Val Glu Ala Leu Asp Asn Gly Lys Ala (98-109)

Met Ala Lys Asn Val Asp Val Pro (112-119)

Ala Ala Gly Cys Leu Arg Tyr Tyr Gly Gly Trp Ala Asp Lys Ile Glu Gly  
Lys (121-138)

Val Asp Thr Ala Pro Asp Ser Phe Asn Tyr (140-149)

20 Gly Val Ile Asn Val Ile Thr Gly Phe Gly Lys Ile (211-222)

Ile Tyr Asp Lys Phe Ile Gln Arg Phe Lys Glu Arg Ala Ala (309-322)

Asn Ala Val Gly Asp Pro Phe Ala Ala Thr (324-333)

Gln Phe Asp Arg Ile Met Gly Tyr Ile (343-351)

Gly Pro Val Cys Thr Ile (396-401)

Ala Ile Glu Val Ala Asn Ala Leu Arg (433-441)

25 Arg Glu Leu Gly Glu Ala Ala Leu Asp (469-477)

Die T-Zellepitope errechnen sich aus den Aminosäurepositionen der Midpoints, die N-terminal von einem Lysin (K), C-terminal von einem Prolin (P) flankiert werden (=Flags). Es sind nur dann potentielle T-Zellepitope vorhanden, wenn der "Score-Index" größer als 10 ist.

## B. Alta11

Die folgende Sequenz 5 zeigt die vollständige cDNA-Sequenz von Alta11 und der von ihr abgeleiteten Aminosäuresequenz. Der offene Leserahmen umfaßt 342bp bzw. 114 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 11127 Dalton und entspricht somit dem 11kD großen antigenen Protein, das im Westernblot von 10,3% der Patienten erkannt wird.

Sequenz 5: Alta11=rla2 alt -&gt; 1-phasen Translation 11127 Dalton

(1) ANGABEN ZU SEO ID NO:5

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

**(A) LÄNGE: 342 Basenpaare / 114 Aminosäurereste**

**(B) ART: Nukleinsäure / Protein**

(C) STRANGFORM: ds

(D) TOPOLOGIE: linear

**(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA / Protein**

15 (iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) **ANTISENSE:** nein

**(v) ART DES FRAGMENTS: Gesamtsequenz**

**(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:**

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

**(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen**

20

DNA Sequenz 342 b.p. ATGAAGCACCTC ... CTCTTCGACTAA linear

	1	/	1							31	/	11							
	ATG	AAG	CAC	CTC	GCG	GCA	TAC	CTC	CTC	GGC	CTT	GGT	GGC	AAC	ACE	TCG	CCC	TCC	GCT
	met	lys	his	leu	ala	ala	tyr	leu	leu	gly	leu	gly	gly	asn	thr	ser	pro	ser	ala
	61	/	22							91	/	31							
	GCC	GAC	GTC	AAG	GCC	GTC	CTT	GAG	TCC	GTT	GGT	ATC	GAG	GCT	GAC	TCC	GAC	CGT	CTT
	ala	asp	val	lys	ala	val	leu	glu	ser	val	gly	ile	glu	ala	asp	ser	asp	arg	leu
	122	/	41							151	/	51							
25	AAG	CTG	ATC	TCC	GAG	CTT	GAG	GGC	AAG	GAC	ATC	AAC	GAG	CTC	ATC	GCT	TCC	GGT	TCC
	lys	leu	ile	ser	glu	leu	glu	gly	lys	asp	ile	asn	glu	leu	ile	ala	ser	gly	ser
	181	/	61							221	/	71							
	AAG	CTT	GCT	TCC	GTT	CCC	TCC	GGT	GGT	GCC	GgT	GGT	GCT	GCC	GCT	TCC	GGT	GGT	GCT
	lys	leu	ala	ser	val	pro	ser	gly	gly	ala	gly	gly	ala	ala	ala	ser	gly	gly	ala
	241	/	81							271	/	91							
	GCC	GCT	GGT	GGC	TCC	GCT	CAG	GCT	GAG	GcC	GCT	CCT	GAG	Gcc	GCC	AAG	GAG	GAG	AAG
	ala	ala	gly	gly	ser	ala	gln	ala	glu	ala	ala	pro	glu	ala	ala	lys	glu	glu	lys
	301	/	101							331	/	111							
	GAG	GAG	TCT	GAC	GAG	GAC	ATG	GGT	TTC	GGT	CTC	TTC	GAC	TAA					
	glu	glu	ser	asp	glu	asp	met	gly	phe	gly	leu	phe	asp	OCH					

30

Homologiesuchen in der SWISSPROT-Proteindatenbank ergaben hier Homologien zum ribosomalen Protein P2. Dieses ribosomale Protein ist an der

Bildung der großen Untereinheit der Ribosomen beteiligt. Somit ist auch zwangsläufig eine Homologie zu Clah11, dem Gegenstück von Alta11 in *Cladosporium herbarum*, vorhanden. Die Identitäten und Homologien zwischen Alta11 und Clah11 werden aus der folgenden Sequenz 6 heraus ersichtlich. Die Identität der beiden Proteine liegt bei 74%, der Homologiegrad wächst auf 84%, was 5 zweifelsohne auf eine ähnliche Funktion dieser beiden Proteine hinweist.

## Sequenz 6:

rla2\_alt x rla2\_clado

10

```

1 MKHLAAYLLLGLGGNTSPSAADVKALESVGI EADSDRLDKLISELEGKD 50
  ||.||||:|||| ||.||||.:|.||.||||:|... : |:.|||||
1 MKYLAAFLLLGL.GNSSPSAEDIKTVLSSVGIDADEEPSQLLLKELEGKD 49

51 INELIASGSEKLASVPSGGAGGAAASGGAAAAGGSAQAEAAPEAAKEEEK 100
  |||||.|||||||:|.:|:|:|:| | | | | |
50 INELISSGSEKLASVPSGGAGAASAGGAAAAGG.....AEEKAEEEEK 92

```

15

```

101 EESDEDMGFGLFDZ 114
  ||||:|||||||
93 EESDDDMGFGLFDZ 106

```

Saure ribosomale Proteine (wie P0, P1 und P2) von verschiedenen Organismen wurden mit einer Vielzahl von Techniken analysiert. Man unterscheidet A-Proteine (acidic) oder P-Proteine (phosphorylierte A-Proteine). Ein Merkmal der 20 A-Proteine sind die große Zahl hydrophober Aminosäuren. Sie können deshalb relativ leicht vom Ribosom dissoziiert werden (50% Ethanol und hohe Salzkonzentration). Das am besten charakterisierte A-Protein in Prokaryonten ist das L7/L12 Protein von *Escherichia coli*. Die eukaryontischen Homologen sind die Proteine P1 und P2, die wie auch das L7/L12 Protein mit dem Elongationsfaktor EF1 und EF2 interagiert. Die C-terminale Sequenz beinhaltet ein Epitop, das von 25 Autoantikörpern von Lupus-patienten erkannt wird (Francoeur et al. 1985, Rich et al. 1987, Hines et al. 1991). Das P2 Protein entspricht in seiner Homologie dem allergenen Protein Alta11.

Die gezeigten B-Zellepitope in der nächsten Sequenz 7 sind unter Berücksichtigung von Sekundärstruktur, Oberflächenlage, Hydrophilität, Flexibilität 30 etc. berechnet worden.

**Sequenz 7: Alta11=rla2\_alt: B-Zellepitope**

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: einzeln angeführt

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

10 (A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Leu Gly Gly Asn Thr Ser Pro Ser Ala Ala Asp (12-22)

Ile Glu Ala Asp Ser Asp Arg Leu Asp Lys Leu Ile Ser (32-44)

Glu Leu Glu Gly Lys Asp Ile Asn Glu Leu (45-54)

15 Ala Ser Gly Ser Glu Lys Leu Ala Ser (56-64)

Pro Glu Ala Ala Lys Glu Glu Glu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Asp Met Gly Phe (92-109)

Die folgende Sequenz 8 zeigt die berechneten T-Zellepitope und stellt die Aminosäuren im 1-Lettercode dar.

20 **Sequenz 8: Vorausgesagte amphipathatische Segmente**

T-Zellepitope

RLDKLISELEGKDINELIASG

EKLASVPSGG

25 (1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

30 (iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Arg Leu Asp Lys Leu Ile Ser Glu Leu Glu Gly Lys Asp Ile Asn Glu Leu Ile Ala Ser Gly  
(38-58)

5 Glu Lys Leu Ala Ser Val Pro Ser Gly Gly (60-69)

Die T-Zellepitope errechnen sich aus den Aminosäurepositionen der Midpoints, die N-terminal von einem Lysin (K), C-terminal von einem Prolin (P) flankiert werden (=Flags). Es sind nur dann potentielle T-Zellepitope vorhanden, wenn der "Score-Index" größer als 10 ist.

10

### C. Alta22

Die nachfolgende Sequenz 9 zeigt die vollständige cDNA Sequenz von  
15 Alta22. Die daraus abgeleitete Protein Primärsequenz ist ebenfalls aus der Sequenz ersichtlich. Der offene Leserahmen des allergenen Proteins beträgt 615bp, was einer Aminosäurelänge von 205 Aminosäuren entspricht. Das errechnete Molekulargewicht des rekombinanten Proteins beträgt 22041 Dalton. Laut bisheriger Analyse steht dem reifen Protein keine Signalsequenz voran.

20 Sequenz 9: YCP4\_alt -> 1-phasen Translation 22041 Dalton

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 615 Basenpaare / 205 Aminosäurereste

(B) ART: Nukleinsäure / Protein

25 (C) STRANGFORM: ds

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA / Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTISENSE: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: Gesamtsequenz

30 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

DNA sequence 615 b.p. ATGGCTCCCAAG ... GCGCATCAGTGA linear

```

1   /   1                               31  /   11
5  ATG GCT CCC AAG ATC GCG ATT GTG TAC TAC TCC ATG TAC GGC CAC ATC AAG AAG ATG GCC
   met ala pro lys ile ala ile val tyr tyr ser met tyr gly his ile lys lys met ala
   61 /   22                               91 /   31
   GAT GCT GAG TTG AAG GGT ATC CAA GAG GCT GGC GGT GAT GCC AAG CTC TTC CAA GTC GCC
   asp ala glu leu lys gly ile gln glu ala gly gly asp ala lys leu phe gln val ala
   122 /  41                               151 /  51
   GAG ACC CTG CCT CAG GAA GTC CTC GAC AAG ATG TAC GCG CCC CCC AAG GAC TCA TCG GTC
   glu thr leu pro gln glu val leu asp lys met tyr ala pro pro lys asp ser ser val
   181 /  61                               221 /  71
   CCC GTC CTC GAG GAC CCA GCC GTC CTC GAA GAA TTT GAC GGC ATC CTC TTC GGC ATC CCC
   pro val leu glu asp pro ala val leu glu glu phe asp gly ile leu phe gly ile pro
   241 /  81                               271 /  91
10 ACC GCG TAC GGC AAC TTC CCC GCA CAA TTC AAG ACC TTC TGG GAC AAG ACA GGC AAG CAA
   thr arg tyr gly asn phe pro ala gln phe lys thr phe trp asp lys thr gly lys gln
   301 / 101                               331 / 111
   TGG CAA CAA GGC GCC TTT TGG GGA AAG TAC GCC GGT GTC TTC GTT TCG ACG GGC ACC CTG
   trp gln gln gly ala phe trp gly lys tyr ala gly val phe val ser thr gly thr leu
   361 / 122                               391 / 131
   GCGGGT GGC CAG GAG ACG ACT GCC ATT ACC AGC ATG AGC ACG CTT GTC GAC CAC GGT TTC
   gly gly gly gln glu thr thr ala ile thr ser met ser thr leu val asp his gly phe
   422 / 141                               451 / 151
   ATC TAC GTT CCC CTT GGC TAC AAG ACT GCG TTT AGC ATG TTG GCC AAC TTG GAC GAG GTC
   ile tyr val pro leu gly tyr lys thr ala phe ser met leu ala asn leu asp glu val
   481 / 161                               511 / 171
15 CAC GGT GGA AGC CCA TGG GGT GCT GGT ACC TTC TCT GCC GGC GAT GGA TCG AGG CAG CCC
   his gly gly ser pro trp gly ala gly thr phe ser ala gly asp gly ser arg gln pro
   541 / 181                               571 / 191
   AGT GAG CTT GAG CTC AAC ATT GCG CAG GCT CAG GGT AAG GCT TTC TAC GAG GCT GTT GCC
   ser glu leu glu leu asn ile ala gln ala gln gly lys ala phe tyr glu ala val ala
   601 / 201
   AAG GCG CAT CAG TGA
   lys ala his gln opa

```

Homologiesuchen mit dem sequenzierten Protein in der  
 20 SWISSPROT-Proteindatenbank zeigten, daß das Allergen Alta22 signifikante  
 Homologie zu dem Hefeprotein YCP4 aufweist. Die Identität der beiden Proteine  
 beträgt 56%, die Homologie steigt sogar auf 72% an. Eine so hohe Ähnlichkeit läßt  
 wohl eine gemeinsame Funktion dieser beiden Proteine annehmen. Die nachfolgende  
 Sequenz 10 spiegelt die hohe Homologie von Alta22 und YCP4 wieder.

25 Sequenz 10:

ycp4\_alt x ycp4\_yeast

```

1  MAPKIAIVYYSMYGHIKKMADAELKGIQZAGGDAKLFQVAETLPQEVLDK 50
   |. . . . .| . . . . .| . . . . .| . . . . .| . . . . .|
1  MV.KIAIITYSTYGHIDVLAQAVIKGVEAAGGKADIYRVEZETLPDEVLT 49

30 51 MYAPPKDSSVPVLEDPVLEEFDGILPGIPTRYGNFPAQFKTFWDKTGKQ 100
   | . . . . .| . . . . .| . . . . .| . . . . .| . . . . .|
   50 MNAPQKPEDIPVATEKTLLE.YDAFLGVPVTRFGNLPQWSAFWDKTGGL 98

101 WQQGAFWGRKYAGVFVSTGTGGLGGQZETTAITSMSTLVDEHGFYVPLGYKTA 150

```

[illegible]

5

Was ist aber nun die Funktion von YCP4: Die Sequenz, bzw. der offene Leserahmen von YCP4, wurde im Rahmen des Hefegenomprojektes am Chromosom 3 von *Saccharomyces cerevisiae* lokalisiert und publiziert (Biteau et al. 1992). Eine Disruption von YCP4 zeigte nach Biteau et al. (1992) keinen Phänotyp. Durchgeführte verfeinerte Phänotypanalysen deuten aber darauf hin, daß Hefe YCP4 eine Funktion als Hitzeschockprotein besitzen könnte. Dieser Versuch zeigt nebenbei, wie wichtig *Saccharomyces cerevisiae* für die Funktionsanalyse von Allergenen sein kann. Die leichte Transformierbarkeit, verbunden mit ausgereiften Methoden der Molekulargenetik ermöglichen es, Gene in Hefe zu disruptieren und den daraus resultierenden Phänotyp zu analysieren.

Es hat sich auch gezeigt, daß auch Alta22 seinen homologen Partner in *Cladosporium herbarum* besitzt. Die folgende Sequenz 11 zeigt ein "multiple sequence alignment" zwischen dem Hefe YCP4 und den Allergenen Alta22 und Clah22.

## 20 Sequenz 11:

		1		50
	pileup.msf(YCP4_altpro)	MAPKIAIVYY	SmYGHikkkMA	DAELKGIQEA
	pileup.msf(YCP4_cladopro)	MAPKIAIIYF	STWGHVqtLA	EAEaKGirEA
	pileup.msf(ycp4_ yeast)	.mvKIAIITy	STYGHIdvLA	qavkKGvEaA
	Consensus	---KIAI--Y	S--GH----A	-A--KG---A
			GG-----V	ETL--EVL-K
		51		100
	pileup.msf(YCP4_altpro)	MyAPPKDsSV	PVleDPaVLE	eFDgIlFGIP
25	pileup.msf(YCP4_cladopro)	MnAPPKDDSI	PeITDPfILE	qYdRfPhGhP
	pileup.msf(ycp4_ yeast)	MnAPqKpEdI	PVaTEktILE	.YDAFLFGVP
	Consensus	M-AP-K----	P-----LE	--D-----G-P
				TR-GN-PAQ-
				--FWD-TG--
		101		150
	pileup.msf(YCP4_altpro)	WQqGAFWgKY	AGVFVSTGTl	GGGQETtAit
	pileup.msf(YCP4_cladopro)	WQtGAFWgKY	AGlFISTGTq	GGGQESTAlA
	pileup.msf(ycp4_ yeast)	WakGsLnKa	AGlFVSTssy	GGGQESTvKa
	Consensus	W--G---GK-	AG-F-ST---	GGGQE-T---
				--S-L--HG-
				I--FLGYKs
		151		200
	pileup.msf(YCP4_altpro)	FaMLAnlDEV	HGGSPWGAGT	FsAGDGSRQP
30	pileup.msf(YCP4_cladopro)	FhLLgdnsEV	rgaavWGAGT	FSGGDGSRQP
	pileup.msf(ycp4_ yeast)	FaeLAsiEEV	HGGSPWGAGT	LaGpDGSRTa
	Consensus	F--L-----EV	-G---WGAGT	---DGSR--
				S--EL-----
				OGK-FYE--

```

                201                                249
pileup.msf(YCP4_altpro) KahqZ.....
pileup.msf(YCP4_cladopro) KvnfQz.....
pileup.msf(ycp4_yeast) Klfpakeakp stekkttsd aakrqtkpaa attaeckedk gliscctvm
Consensus K-----

```

Die mit Computerunterstützung gefundenen B-Zellepitope sind in der 5 nächsten Sequenz 12 zu sehen.

Sequenz 12: Alta22=YCP4\_alt: B-Zellepitope

(1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10 (A) LÄNGE: einzeln angeführt

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15 (A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

Lys Met Tyr Ala Pro Pro Lys Asp Ser Ser Val (50-60)

Ile Pro Thr Arg Tyr Gly Asn Phe Pro (79-87)

Gln Phe Lys Thr Phe Trp Asp Lys Thr Gly Lys Gln Trp Gln Gln Gly Ala Phe Trp Gly Lys Tyr

Ala Gly (89-112)

20 Gly Thr Leu Gly Gly Gly Gln Glu Thr Thr Ala Ile Thr Ser (118-131)

Leu Asp Glu Val His Gly Gly Ser Pro Trp Gly Ala Gly Thr (157-170)

Phe Ser Ala Gly Asp Gly Ser Arg Gln Pro Ser Glu Leu Glu Leu (171-185)

Die nachfolgende Sequenz 13 zeigt die berechneten T-Zellepitope. Amphipathische Bereiche mit einem Score geringer als 10 werden als nicht relevant angenommen.

25 Sequenz 13: Vorausgesagte amphipathische Segmente

T-Zellepitope

SMYGHKKMAD

GIQEA

LFQVAETLPQEVLDKMYA

30 AVLEEFDDGI

TRYGNFPAQFKTFWDKTGKQW

TAITSMSTL  
FSMLANLDEVHG  
QGKAFYEAVA

5 (1) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: einzeln angeführt

(B) ART: Protein

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptide

10 (iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus bis C-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alternaria alternans*

(C) ENTWICKLUNGSSTADIUM: Sporen und vegetative Hyphen

15 Ser Met Tyr Gly His Ile Lys Lys Met Ala Asp (11-21)

Gly Ile Gln Glu Ala (26-30)

Leu Phe Gln Val Ala Glu Thr Leu Pro Gln Glu Val Leu Asp Lys Met Tyr Ala (36-53)

Ala Val Leu Glu Glu Phe Asp Gly Ile (67-75)

Thr Arg Tyr Gly Asn Phe Pro Ala Gln Phe Lys Thr Phe Trp Asp Lys Thr Gly Lys Gln Trp  
(81-101)

20 Thr Ala Ile Thr Ser Met Ser Thr Leu (127-135)

Phe Ser Met Leu Ala Asn Leu Asp Glu Val His Gly (151-162)

Gln Gly Lys Ala Phe Tyr Glu Ala Val Ala (191-200)

Die T-Zellepitope errechnen sich aus den Aminosäurepositionen der  
25 Midpoints, die N-terminal von einem Lysin (K), C-terminal von einem Prolin (P)  
flankiert werden (=Flags). Es sind nur dann potentielle T-Zellepitope vorhanden,  
wenn der "Score-Index" größer als 10 ist.

**Literatur**

- Agarwal, M.K., Jones, R.T., Yunginger, J.W. (1982).  
5 Shared allergenic and antigenic determinants in *Alternaria* and *Stemphylium* extracts.  
J. Allergy Clin. Immunol. 70 (6), 437.
- Birkner, T., Rumpold, H., Jarolim, E. Ebner, H., Breitenbach, M., Skarvil, F.,  
Scheiner, O., Kraft, D. (1990).  
10 Evaluation of immunotherapy-induces changes in specific IgE, IgG and IgG  
subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation  
with clinical response.  
Allergy 45, 418.
- Biteau, N., Fremaux, C., Hebrard, S., Menara, A., Aigle, M., Crouzet, M. (1992).  
The complete sequence of a 10.8kb fragment to the right of the chromosome III  
15 centromere of *Saccharomyces cerevisiae*.  
Yeast 8, 61.
- Bousquet, J., Becker, W.M., Hejjaoudi, A. (1991).  
Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens  
and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double blind, placebo-controlled,  
20 specific immunotherapy with standardized extracts.  
J. Allergy Clin. Immunol. 88, 43.
- Budd, T.W. (1986).  
Allergens of *Alternaria*.  
Grana 25, 147.
- 25 Francoeur, A.M., Peebles, C.L., Heckman, K.J., Lee, J.C., Tan, E.M. (1985).  
Identification of ribosomal protein autoantigens.  
J. Immunol. 135, 1767.
- Harada, S., Agarwal, D.P., Goedde, H.W. (1982).  
30 Mechanism of alcohol sensitivity and disulfiram-ethanol reaction.  
Subst. Alco. Act. Misuse. 3, 107.

Hines, J.J., Weissbach, H., Brot, N., Elkon, K. (1991).

Anti-P autoantibody production requires P1/P2 as immunogens but is not driven by exogenous self-antigen in mrl mice.

J. Immunol. 146, 3386.

5

Klein, J. (1991).

VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

Immunologie.

Margalit, H., Spogue, J.L., Cornette, J.L., Cease, K.B., Delisi, C., Berzofsky,

10 J.A. (1987).

Prediction of immunodominant Helper T cell antigenic sites from the primary sequence.

J. Immunol. 138, 2213.

Miyamoto, T. (1992).

15 Advances in Allergology and Clinical Immunology.

Eds. Ph Godard, J. Bousquet, F.B. Miches.

EAACI Congress Paris, 10-15, May 1992.

The Parthenon Publishing Group, Casterton Hall U.K., New Jersey, USA p.343.

Nyholm, L., Löwenstein, H., Yunginger, J.W. (1983).

20 Immunochemical partial identity between two independently identified and isolated major allergens from *Alternaria alternata* (Alt-1 and Ag1).

L. Allergy Clin. Immunol. 71 (5), 461.

Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M.P. (1991).

Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors

25 show a different profile of cytokine production.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4538.

Rammensee, H.G., Falk, K., Rötzschke, O. (1993).

MHC molecules as peptide receptors.

Current Opinion in Immunol. 5, 35.

30

Rich, B.E., Steitz, J.A. (1987).

Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1 and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis and assembly.

Mol. Cell. Biol. 7, 4065.

5 Roitt, I. (1991).

Essential Immunology 7th Edition.

Oxford Blackwell scientific publications. London Edinburgh Boston Melbourne Paris  
Berlin Vienna

Rothbard, J.B., Geftter, M.L. (1991).

10 Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins.

Ann. Rev. Immunol. 9, 527.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5468

15

Wüthrich, B. (1991).

Allergy and Clin. Immunol. News 3, 41.

Yunginger, J.W., Jones, R.T., Nesheim, M.E., Geller, M. (1980).

Studies on Alternaria allergens III. Isolation of a major allergenic fraction (Alt-1).

20 J. Allergy Clin. Immunol. 66 (2), 138.

25

30

### Patentansprüche

1. Rekombinante DNA Moleküle, die für Polypeptide kodieren, die die  
5 Antigenität der Allergene Alta53, Alta22 und Alta11 besitzen oder für Peptide, die  
mindestens ein Epitop dieser Allergene aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß sie  
Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die mit den Sequenzen 1, 3-5, 7-9, 12 und 13,  
oder mit Teilbereichen dieser Sequenzen in homologer Weise übereinstimmen, bzw.  
Nucleinsäuresequenzen, die mit den genannten Nucleinsäuresequenzen unter  
stringenten Bedingungen hybridisieren.
- 10 2. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die durch Degeneration aus den  
Sequenzen 1, 3-5, 7-9, 12 und 13 ableitbar sind.
3. Rekombinante DNA Moleküle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch  
gekennzeichnet, daß sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die für Polypeptide  
kodieren, die als Antigene kreuzreaktiv mit den Allergenen Alta53, Alta22 und  
15 Alta11 sind und zu diesen eine hohe Homologie aufweisen.
4. Rekombinante DNA-Moleküle nach Ansprüchen 1 bis 3. dadurch  
gekennzeichnet, daß sie funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz zu einem  
Expressionskonstrukt verbunden sind.
5. Wirtssystem zur Expression von Polypeptiden, dadurch gekennzeichnet,  
daß es mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt nach Anspruch 4 transformiert  
20 ist.
6. Aus einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 abgeleitetes  
rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, dadurch gekennzeichnet,  
daß es die Antigenität von Alta53, Alta22 oder Alta11, oder zumindest von einem  
Epitop dieser Proteine, aufweist.
7. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder ein Polypeptid nach  
25 Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die  
den gezeigten Sequenzen 1, 3-5, 7-9, 12 und 13 zur Gänze oder teilweise entspricht.
8. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Anspruch  
6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fusionsprodukt darstellt, das die  
Antigenität der Allergene Alta53, Alta22 oder Alta11, oder zumindest eines Epitops  
davon, aufweist und einen zusätzlichen Polypeptidanteil besitzt, wobei das gesamte  
30 Fusionsprodukt von der DNA eines Expressionskonstrukts gemäß Anspruch 4 kodiert  
wird.

9. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der besagte zusätzliche Polypeptidanteil  $\beta$ -Galaktosidase oder ein anderes zur Fusion geeignetes Polypeptid ist.

10. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, dadurch gekennzeichnet, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9 enthält.

11. Verfahren zum in vitro -Nachweis der Allergie eines Patienten gegen die Allergene Alta53, Alta22 oder Alta11, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion der IgE Antikörper im Serum des Patienten mit einem rekombinanten oder synthetischen Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 9 gemessen wird.

10 12. Verfahren, zum in vitro - Nachweis der zellulären Reaktion auf die Allergene Alta53, Alta22 oder Alta11, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Stimulierung oder Hemmung der zellulären Reaktion eingesetzt wird.

15

20

25

30

1/1

Fig.1: Westernblotting eines 12,5%iges Polyacrylamidgels, nach Auftrennung von *Alternaria alternata* Proteinextrakt; Inkubation mit Sera verschiedener Patienten; Detektion mit Jod markiertem anti human IgE.

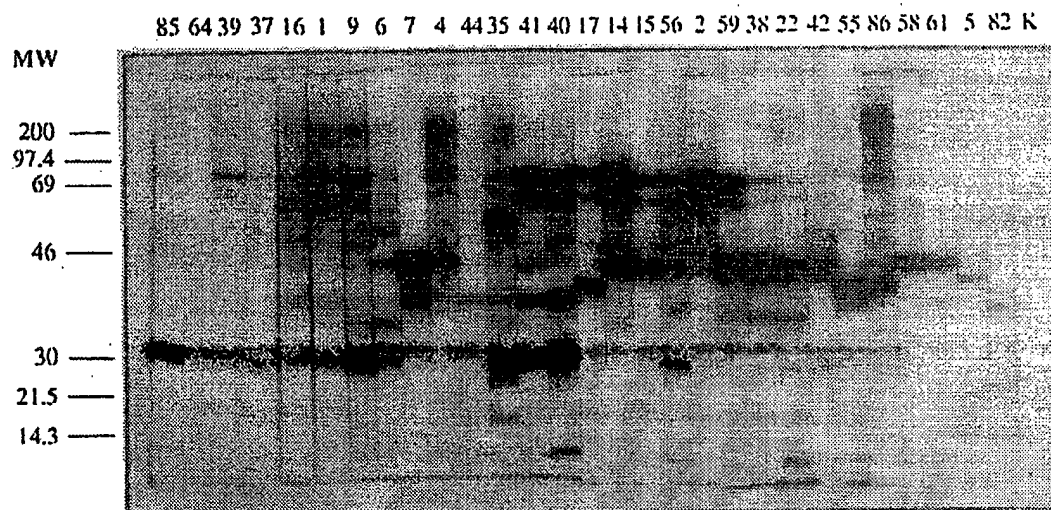


Fig.2 und 3: Expression der rekombinanten Protine Alta52, Alta22 und Alta11 in Bluescript nach IPTG Induktion.

